(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 657 226**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)
C12N 5/16 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.08.2010** **PCT/CN2010/076420**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2011** **WO11023130**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.08.2010** **E 10811290 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018** **EP 2471814**

(54) Título: **Anticuerpo monoclonal anti-VEGF y composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo**

(30) Prioridad:

28.08.2009 CN 200910171550

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.03.2018

(73) Titular/es:

JIANGSU SIMCERE PHARMACEUTICAL CO., LTD (50.0%)
No.699-18, Xuanwu Avenue, Xuanwu District
Nanjing, Jiangsu 210042, CN y
APEXIGEN, INC. (50.0%)

(72) Inventor/es:

LI, PIERRE;
KE, YAOHUANG;
ZHANG, YONGKE;
ZHU, WEIMIN;
YU, GUOLIANG;
MA, FANXIN y
FAN, XIN

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 657 226 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo monoclonal anti-VEGF y composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo técnico de los anticuerpos modificados por ingeniería genética y, en particular, a anticuerpos modificados por ingeniería genética unidos específicamente al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y a la composición farmacéutica y los kits que comprenden dichos anticuerpos.

Antecedentes de la invención

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un factor de crecimiento de unión a la heparina específico para las células endoteliales vasculares, que es capaz de inducir angiogénesis *in vivo*. La proteína VEGF humana fue purificada e identificada con éxito por científicos estadounidenses en 1989, que también clonaron y determinaron su secuencia génica.

El VEGF es capaz de promover la angiogénesis. Todos los miembros de la familia de los VEGF son capaces de activar la reacción celular a través de receptores correspondientes (VEGFR) sobre la superficie de las células de unión, y se dimerizan y activan por fosforilación. Los VEGFR comprenden 7 dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina, un dominio que abarca la membrana y un dominio intracelular que comprende el dominio de tirosina-quinasa. El VEGF A es capaz de unirse al receptor 1 de VEGF (receptor Flt-1) y al receptor 2 de VEGF (KDR/Flk-1). El receptor 2 de VEGF media casi todas las funciones biológicas conocidas del VEGF. El VEGF y su bioactividad y receptores han sido explicados y estudiados en detalle por Matsumoto et al., y Marti et al., (véase "Angiogenesis in ischemic disease". *Thromb Haemost*. 1999 Suppl. 1: 44 - 52; "VEGF receptor signal transduction" *Sci STKE*. 2001: RE21).

El VEGF es una glicoproteína homodimérica altamente conservada, en la que dos cadenas sencillas que tiene cada una un peso molecular de 24 kDa forman el dímero a través de un enlace disulfuro. Debido a los diferentes modos de corte y empalme por mRNA, se desarrollan al menos 5 patrones de proteínas, que incluyen VEGF 121, VEGF 145, VEGF 165, VEGF 185 y VEGF 206, en los que VEGF121, VEGF 145 y VEGF 165 son proteínas secretoras solubles capaces de actuar directamente sobre células endoteliales vasculares, promoviendo la proliferación y migración de las células endoteliales vasculares, y potenciando la permeabilidad vascular.

Las enfermedades relacionadas con VEGF tienen típicamente las siguientes características: sobre-proliferación de células endoteliales vasculares, aumento de la permeabilidad vascular, edema e inflamación tisular, tal como edema cerebral causado por lesiones, ictus o tumor; edema causado por enfermedades inflamatorias, tales como psoriasis o artritis, incluyendo artritis reumatoide; asma; anasarca asociada a quemaduras; ascitis y derrame pleural causados por tumor, inflamación o traumatismo; traqueitis crónica; síndrome de fuga capilar; sapremia; enfermedades renales asociadas a la fuga de proteínas; enfermedades oculares, tales como degeneración macular relacionada con la edad y retinopatía diabética; tumores, incluyendo cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, glioma cerebral, cáncer de riñón, etc.

La unión entre el anticuerpo y su sitio diana es específica, pudiendo mediar en el mecanismo de efecto inmunológico, y teniendo una semivida relativamente larga en suero. Estas características dan como resultado aplicaciones de tratamiento fuertes del anticuerpo.

Actualmente, la FDA y Europa han aprobado la aplicación del anticuerpo monoclonal anti-VEGF de ratón humanizado recombinante, AVASTIN, para el tratamiento de cáncer colorrectal, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de mama, glioma cerebral, cáncer de riñón y degeneración macular relacionada con la edad (AMD), que alcanzó ventas de 4,8 mil millones de dólares estadounidenses en 2008. Sin embargo, el anticuerpo AVASTIN no tiene una alta afinidad por el VEGF. Debido a la producción exclusiva, además, los pacientes deben pagar altos precios. Actualmente, un paciente necesita pagar entre 50.000 y 100.000 dólares estadounidenses por año por el fármaco.

En Liang et al., (2005) J Biol Chem 281 (2):951-961, se describen los anticuerpos anti-VEGF B20 y G6.

El resumen "EPI0030, un anticuerpo monoclonal de conejo anti-VEGF humanizado, presenta una potente actividad en modelos preclínicos", publicado en *Proceeding of the Annual Meeting of the American Association for Cancer Research,* Vol 50, página 296 del 22 de abril de 2009, indica la creación de un nuevo anticuerpo anti-VEGF y los resultados preliminares de sus ensayos, aunque sin describir su secuencia de aminoácidos o cualquier otra característica física o química.

Por tanto, existe la necesidad urgente de desarrollar nuevos anticuerpos monoclonales anti-VEGF, reduciendo con ello las cargas en los pacientes y disminuyendo los costos del tratamiento.

Definiciones

Antes de una descripción adicional de la presente invención, es necesario comprender que la presente invención no

está limitada por las realizaciones específicas descritas. En otras palabras, pueden hacerse variaciones en formatos específicos. Se debe observar además que puesto que el alcance de la presente invención está sujeto a las reivindicaciones adjuntas, los términos en la presente memoria sólo pretenden describir las realizaciones específicas, en lugar de limitar la presente invención.

En la presente memoria se pueden usar indistintamente los términos “anticuerpo” e “inmunoglobulina”. Estos términos son bien conocidos por los expertos en la técnica y se refieren específicamente a proteínas constituidas por uno o más polipéptidos capaces de unirse específicamente a antígenos. Una forma del anticuerpo constituye una unidad estructural básica del anticuerpo, que es tetrámero. Consiste en dos pares de cadenas de anticuerpos completamente idénticas, teniendo cada par una cadena ligera y una cadena pesada. En cada par de cadenas del anticuerpo, los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada están unidos siendo responsables de la unión a los antígenos, mientras que los dominios constantes son responsables de las funciones efectoras del anticuerpo.

Los polipéptidos inmunoglobulinas conocidos actualmente comprenden las cadenas ligeras, κ y λ, y las cadenas pesadas, α, γ (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), δ, ε y μ, u otras equivalentes. La “cadena ligera” de inmunoglobulina (aproximadamente 25 kDa o aproximadamente 214 aminoácidos) en su longitud completa comprende un dominio variable que consta de aproximadamente 110 aminoácidos en el extremo NH_2, y un dominio constante, κ o λ, en el extremo COOH. De forma similar, la “cadena pesada” de inmunoglobulina (aproximadamente 50 kDa o aproximadamente 446 aminoácidos) en su longitud completa comprende un dominio variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los dominios constantes de la cadena pesada, tal como γ (aproximadamente 330 aminoácidos).

Los términos “anticuerpo” e “inmunoglobulina” comprenden cualquier isoforma de anticuerpos o inmunoglobulinas, o segmentos de anticuerpos que todavía estén específicamente unidos a antígenos, incluyendo, aunque sin limitación, segmentos Fab, Fv, scFv y Fd, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo monocatenario, así como proteínas de fusión que tienen porciones de anticuerpos de unión a antígenos y proteínas que no son anticuerpos. Los anticuerpos pueden ser marcados y detectados, por ejemplo, por isótopos radiactivos, enzimas capaces de producir sustancias analizables, proteínas fluorescentes y biotinas. Además, los anticuerpos se pueden unir a vehículos sólidos, incluyendo, aunque sin limitación, placas o perlas de poliestireno. Dicho término comprende además los segmentos de anticuerpos Fab', Fv, $F(ab')_2$ y/u otros segmentos y anticuerpos monoclonales capaces de unirse específicamente a antígenos.

Los anticuerpos también pueden existir en una diversidad de formas, por ejemplo, que comprenden Fv, Fab y $(Fab')_2$, así como anticuerpos híbridos bifuncionales (por ejemplo, Lanzavecchia et al., *Eur. J. Immunol*, 1987; 17, 105), y en forma monocatenaria (por ejemplo, Huston et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1988; 85, 5879 y Bird et al., *Science*, 1988; 242, 423, que se citan en la presente memoria como referencia). Los dominios variables de la cadena pesada o de la cadena ligera de inmunoglobulina consisten en tres dominios hipervariables (también denominados “región determinante de la complementariedad” o CDR). Estos dominios hipervariables están separados por regiones de entramado (FR). Los alcances de FR y CDR han sido definidos con precisión (véase "Sequences of Proteins of Immunological Interest", E. Kabat et al., U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Las secuencias de aminoácidos de todos los anticuerpos estudiados en la presente memoria se clasifican por referencia al sistema de Kabat. Se conservan relativamente las diferentes secuencias de la FR de la cadena ligera y de la cadena pesada de la misma especie. Las FR de anticuerpos se usan para posicionar y calibrar las CDR. Las CDR son principalmente responsables de la unión a epítopos de antígenos.

Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo con genes construidos de cadena pesada y cadena ligera, en particular un anticuerpo con genes de dominio variable y de dominio constante que están modificados por ingeniería genética y pertenecen a diferentes especies. Por ejemplo, segmentos de dominio variable de genes de anticuerpos monoclonales de ratón están unidos a segmentos de dominio constante de anticuerpos humanos, tales como γ1 y γ3. Por ejemplo, los anticuerpos quiméricos usados en el tratamiento médico son un tipo de proteínas quiméricas, que son segmentos de dominio variable de anticuerpos de conejo o segmentos de dominio de unión a antígenos combinados con dominios constantes de anticuerpos humanos o dominios efectores (por ejemplo, el anticuerpo quimérico anti-Tac preparado con la célula depositada con el número de registro de ATCC No. CRL 9688). Naturalmente, los anticuerpos quiméricos también pueden usar genes de otras especies de mamíferos.

Los términos “anticuerpo humanizado” e “inmunoglobulina humanizada” tienen el mismo significado. En comparación con la forma no humanizada de un anticuerpo, su anticuerpo humanizado reduce típicamente la inmunorreacción en el hospedante humano.

Debe entenderse que el anticuerpo humanizado diseñado y producido de acuerdo con la presente invención puede reemplazar algunos aminoácidos conservadores, que no tienen sustancialmente impacto sobre la unión al antígeno u otras funciones del anticuerpo. En otras palabras, los aminoácidos pueden ser sustituidos mutuamente en las combinaciones de gly y ala; val, ile y leu; asp y glu; asn y gln; ser y thr; lys y arg; phe y tyr. Los aminoácidos que no están en el mismo grupo son aminoácidos “sustancialmente diferentes”.

En algunas realizaciones, la afinidad entre un anticuerpo y su sitio diana se representa por K_d (constante de

disociación), que es inferior a 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M o aproximadamente 10^{-12} M o inferior.

El "dominio variable" de una cadena pesada o de una cadena ligera de un anticuerpo es la región madura en el extremo N de dicha cadena. Todos los dominios, las CDR y los números de residuos son definidos por la alineación de secuencias y se basan en el conocimiento estructural existente. La determinación y la numeración de residuos de la FR y de la CDR se basan en lo que han descrito Chothia y otros (Chothia, "Structural determinants in the sequences of immunoglobulin variable domain". *J Mol Biol*. 1998; 278, 457).

VH es el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo. VL es el dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo, que puede comprender los isotipos κ y λ. El anticuerpo K-1 tiene el isotipo κ-1, mientras que el anticuerpo K-2 tiene el isotipo κ-2, y Vλ es la cadena ligera λ variable.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se pueden usar indistintamente en la presente memoria. Ambos se refieren a aminoácidos polimerizados de cualquier longitud, que pueden comprender aminoácidos codificantes y no codificantes, aminoácidos derivados o modificados química o bioquímicamente y polipéptidos que tienen esqueletos peptídicos modificados. Dichos términos comprenden proteínas de fusión, incluyendo, aunque sin limitación, proteínas de fusión que tienen secuencias de aminoácidos heterogéneas; proteínas de fusión que tienen secuencias delanteras heterogéneas y homogéneas, con o sin residuos de metionina en el extremo N; proteínas con etiquetas inmunológicas; proteínas de fusión con parejas de fusión detectables, por ejemplo, proteínas de fusión que pueden funcionar como parejas de fusión, incluyendo proteína fluorescente, β-galactosidasa, fluoresceína, etc. Los polipéptidos pueden ser de cualquier longitud, y el término "péptido" se refiere a polipéptidos de 8 - 50 residuos de longitud (por ejemplo, 8 - 20 residuos).

Los términos "sujeto", "hospedante", "paciente" e "individuo", se pueden usare indistintamente en la presente memoria y se refieren específicamente a cualquier mamífero, en particular seres humanos, que son diagnosticados o tratados. Otros sujetos pueden comprender mono, vaca, perro, gato, cobaya, conejo, rata, ratón, caballo, etc.

"Aminoácidos correspondientes" se refieren a residuos de aminoácidos en las mismas posiciones (es decir, se corresponden entre sí) cuando se comparan dos o más secuencias de aminoácidos. Los métodos de comparación y numeración de secuencias de anticuerpos han sido descritos en detalle por Chothia (véase anteriormente), Kabat (véase anteriormente) y otros. Los expertos en la técnica saben (véase, por ejemplo, Kabat 1991 "Sequences of Proteins of Immunological Interest", DHHS, Washington, DC) que algunas veces se pueden insertar uno, dos o tres huecos y/o 1, 2, 3 o 4 residuos o como máximo aproximadamente 15 residuos (en particular en las CDR L3 y H3) en uno o dos aminoácidos de un anticuerpo, completando así una comparación.

"Posición sustituible" se refiere a una posición especial de un anticuerpo, que puede ser sustituida por diferentes aminoácidos sin reducir significativamente la actividad de unión del anticuerpo. Los métodos para determinar las posiciones sustituibles y cómo se pueden sustituir se describirán con más detalle más adelante. La posición sustituible también puede denominarse "posición tolerante a la variación".

El anticuerpo "precursor" se refiere al anticuerpo diana de sustitución del aminoácido. En algunas realizaciones, un anticuerpo "donante", "donará" aminoácidos a un anticuerpo precursor para producir un anticuerpo modificado. "Anticuerpo asociado" se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia similar y es producido por células que tienen el ascendiente de linfocitos B común. Este ascendiente de linfocitos B comprende un genoma que tiene dominios VJC de la cadena ligera transpuestos y dominios VDJC de la cadena pesada transpuestos, y además, produce anticuerpos que no han experimentado maduración de afinidad. El linfocito B "sin tratamiento" o "primario" que existe en el tejido del bazo es el ascendiente común de los linfocitos B. Las uniones de los anticuerpos asociados con un epítopo idéntico tienen típicamente secuencias muy similares, en particular sus CDR L3 y H3. Todas las CDR H3 y L3 de anticuerpos asociados tienen la misma longitud y casi idéntica secuencia (con 0 - 4 residuos de aminoácidos diferentes). Los anticuerpos asociados están correlacionados por medio del ascendiente de anticuerpo común, es decir, el anticuerpo producido por el ascendiente original de los linfocitos B.

Sumario de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo monoclonal que tenga mayor afinidad por VEGF. El anticuerpo monoclonal anti-VEGF de acuerdo con la presente invención tiene el dominio variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2 y SEQ ID NO. 3, y/o el dominio variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6.

El "anticuerpo" en la presente memoria debe ser interpretado como que abarca cualquier factor de unión específico que tenga el dominio de unión con la especificidad requerida. Por tanto, este término abarca segmentos homogéneos de anticuerpos, sus derivados y anticuerpos humanizados. Los ejemplos del anticuerpo son subtipos de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) y sus subtipos y subclases. También se incluyen moléculas quiméricas fusionadas a otro polipéptido y que comprenden dominio de unión a antígenos o sus equivalentes. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos están descritas en los documentos EP. A-0120694 y EP. A-0125023.

El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención puede ser, por ejemplo, un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

Los anticuerpos se pueden modificar por una variedad de modos, se pueden producir otros anticuerpos o moléculas quiméricos que retengan la especificidad del anticuerpo original usando la tecnología de DNA recombinante. Esta tecnología puede introducir DNA que codifique dominios variables de inmunoglobulina o las CDR del anticuerpo en dominios constantes o dominios constantes más regiones de entramado de diferentes inmunoglobulinas. Véanse los documentos EP. A-184187, GB 2188638A o EP. A-239400. La mutación genética u otros cambios se pueden realizar en hibridomas u otras células que produzcan anticuerpos, que pueden cambiar o no cambiar la especificidad de unión de los anticuerpos producidos.

Además de los dominios altamente variables CDR1, CDR2 y CDR3 en las cadenas pesadas y las cadenas ligeras, y las secuencias enlazadoras, la parte restante del anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención es la región de entramado. La región de entramado puede ser reemplazada por otras secuencias, siempre que la estructura tridimensional requerida por la unión no se vea afectada. La base molecular de la especificidad del anticuerpo proviene principalmente de sus dominios altamente variables CDR1, CDR2 y CDR3, que son posiciones clave para unirse a antígenos. Para mantener la especificidad de unión preferida, las secuencias de CDR deben conservarse tanto como sea posible.

En algunas realizaciones preferidas, un anticuerpo monoclonal comprende los dominios variables siguientes: un dominio variable de la cadena pesada que comprende, por ejemplo, la SEQ ID NO. 7, que comprende CDR1 (SNNDVMCW; SEQ ID NO. 1), CDR2 (GCIMTTDVVTEYANWAKS; SEQ ID NO. 2) y CDR3 (RDSVGSPLMSFDLW; SEQ ID NO. 3); y un dominio variable de la cadena ligera que comprende, por ejemplo, la SEQ ID NO. 8, que comprende CDR1 (QASQSIYNNELS; SEQ ID NO. 4), CDR2 (RASTLAS; SEQ ID NO. 5) y CDR3 (GGYKSYSNDGNG; SEQ ID NO. 6).

En otras realizaciones, el anticuerpo puede comprender: a) un dominio variable de la cadena pesada, cuya secuencia de aminoácidos es diferente de la SEQ ID NO. 7 al tener como máximo 6 sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos; y b) un dominio variable de la cadena ligera, cuya secuencia de aminoácidos es diferente de la SEQ ID NO. 8 al tener como máximo 6 sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos. El anticuerpo diana puede comprender una cualquiera de estas sustituciones o sus combinaciones.

De manera similar, el anticuerpo que tiene una cualquiera de estas posiciones de sustitución y el anticuerpo que tiene todas las posiciones de sustitución tienen actividades de unión a VEGF. Las sustituciones de aminoácidos pueden existir en las regiones de entramado. En algunas realizaciones preferidas, por tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones de entramado del dominio variable de la cadena pesada pueden ser diferentes de la SEQ ID NO. 7 al tener como máximo 6 sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos, y las secuencias de aminoácidos de las regiones de entramado de los dominios variables de la cadena ligera pueden ser diferentes de la SEQ ID NO. 8 al tener como máximo 6 sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 sustituciones de aminoácidos.

En una realización preferida especial, el anticuerpo puede comprender: a) un dominio variable de la cadena pesada, cuya secuencia de aminoácidos es la misma que la SEQ ID NO. 7, y b) un dominio variable de la cadena ligera, cuya secuencia de aminoácidos es la misma que la SEQ ID NO. 8.

En una realización preferida especial, el anticuerpo puede comprender: a) un dominio variable de la cadena pesada, cuya secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos 95% con la SEQ ID NO. 7, y b) un dominio variable de la cadena ligera, cuya secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos 95% con la SEQ ID NO. 8. Por tanto, el anticuerpo diana puede comprender: a) un dominio variable de la cadena pesada, cuya secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con la SEQ ID NO. 7, y b) un dominio variable de la cadena ligera, cuya secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con la SEQ ID NO. 8.

En una realización preferida especial, el anticuerpo puede comprender: a) una cadena pesada, cuya secuencia de aminoácidos es la misma que la SEQ ID NO. 9 y b) una cadena ligera, cuya secuencia de aminoácidos es la misma que la SEQ ID NO. 10.

En una realización preferida especial, el anticuerpo puede comprender: a) una cadena pesada, cuya secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos 95% con la SEQ ID NO. 9, y b) una cadena ligera, cuya secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos 95% con la SEQ ID NO. 10. Por tanto, el anticuerpo diana puede comprender: a) una cadena pesada, cuya secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con la SEQ ID NO. 9, y b) una cadena ligera, cuya secuencia de aminoácidos tiene una identidad de al menos aproximadamente 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% con la SEQ ID NO. 10. Además de las sustituciones de aminoácidos antes descritas, el anticuerpo diana puede tener aminoácidos adicionales en ambos extremos de la cadena pesada o de la cadena ligera. Por ejemplo, el anticuerpo diana puede comprender al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 o más aminoácidos adicionales en el extremo C o N de la cadena

pesada y/o de la cadena ligera, respectivamente. En algunas realizaciones, el anticuerpo diana puede ser más corto que los aminoácidos ilustrativos descritos en la presente memoria, siendo su principal diferencia que los dos extremos de la cadena pesada y la cadena ligera tienen 1, 2, 3, 4, 5 o 6 aminoácidos menos que los aminoácidos ilustrativos, respectivamente.

El anticuerpo diana puede ser humanizado. En términos generales, el anticuerpo humanizado es un anticuerpo modificado realizando la sustitución de aminoácidos en la región de entramado del anticuerpo precursor, y en comparación con el anticuerpo precursor, el anticuerpo humanizado tiene menor inmunogenicidad. Los anticuerpos se pueden humanizar con varias tecnologías que son bien conocidas en la técnica, incluyendo, tales como trasplante de la CDR (ERA-239, 400, publicación PCT WO 91/09967; patentes de EE.UU. Nº 5.225.539; 5.530.101 y 5.585.089) y el barajado de cadenas (Patente de EE.UU. Nº 5.565.332). En algunas realizaciones preferidas, la sustitución del entramado determina la importancia de los residuos del entramado en la unión al antígeno mediante la simulación de la interacción entre las CDR y los residuos de entramado e identifica residuos de entramado inusuales por alineamiento de secuencias (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. Nº 5.585.089; Riechmann, et al., *Nature*, 1988; 332, 323). Para detalles específicos del método de humanización de anticuerpos se hace referencia a la Solicitud de Patente de EE.UU. 10/984.473 presentada el 8 de noviembre de 2004 y titulada “Methods for antibody engineering”. Dicha solicitud se ha incorporado en la presente memoria en su totalidad como referencia. En términos generales, dichos métodos de humanización comprenden la identificación de sitios apropiados por comparación de secuencias de anticuerpos capaces de unirse a antígenos idénticos, y la sustitución de aminoácidos en dichos sitios por diferentes aminoácidos en los mismos sitios de aminoácidos similares. De acuerdo con estos métodos, las secuencias de aminoácidos del anticuerpo precursor se comparan con otros anticuerpos asociados (por ejemplo, alineamiento de secuencias), identificando con ello las posiciones tolerantes a las variaciones. Las secuencias de aminoácidos de dominios variables del anticuerpo precursor se comparan típicamente con secuencias de aminoácidos en bases de datos de anticuerpos humanos, y se selecciona un anticuerpo humanizado con secuencias de aminoácidos similares al anticuerpo precursor. Se comparan las secuencias del anticuerpo precursor y el anticuerpo humanizado (por ejemplo, alineamiento de secuencias), y los aminoácidos en una o más posiciones tolerantes a las variaciones del anticuerpo precursor se sustituyen por aminoácidos en posiciones correspondientes en el anticuerpo humanizado.

El método de sustitución de las posiciones tolerantes a la variación antes descrito puede combinarse fácilmente con cualquier método de humanización conocido, y aplicarse fácilmente en la producción de anticuerpos humanizados que comprenden las CDR, modificándose las CDR de dichos anticuerpos mientras sean fieles a las CDR del anticuerpo precursor. Por tanto, la presente invención proporciona además anticuerpos humanizados neutralizantes del VEGF que comprenden una pluralidad de CDR procedentes de las versiones modificadas del anticuerpo precursor.

En comparación con AVASTIN, un producto de acuerdo con la técnica anterior, el anticuerpo monoclonal anti-VEGF de conejo humanizado de acuerdo con la presente invención tiene una constante de disociación K_d inferior (el anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención tiene una K_d de 0,485 nM, mientras que el de AVASTIN es 47,9 nM), el anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención tiene mayor afinidad por VEGF, lo que indica que la presente invención tiene una inhibición más fuerte sobre VEGF. Los experimentos con modelos de ratón han demostrado que el anticuerpo de acuerdo con la presente invención tiene una tasa de inhibición tumoral notablemente mayor que el AVASTIN (véase el Ejemplo 5). Por tanto, la presente invención tiene teóricamente un efecto de curación clínica potencial mayor que el AVASTIN.

En una realización, el anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención es producido por la línea celular depositada con el número de registro CGMCC Nº 3233, mostrándose su secuencia de aminoácidos de la cadena pesada en la SEQ ID Nº. 9 y su secuencia de aminoácidos de la cadena ligera en la SEQ ID NO. 10. Su constante de disociación con VEGF es 0,485 nM, que es 1/100 de la de AVASTIN, lo que demuestra que EPI0030 tiene una capacidad de unión a VEGF más fuerte que AVASTIN.

La presente invención proporciona además una línea celular, que está depositada en the China General Microbiological Culture Collection Center con el número de registro CGMCC Nº 3233. Produce un anticuerpo monoclonal, teniendo dicho anticuerpo una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada mostrada como SEQ ID NO. 9 y una secuencia de aminoácidos de la cadena ligera mostrada como SEQ ID NO. 10. En realizaciones de acuerdo con la presente invención, se denomina anticuerpo EPI0030. Los experimentos en células y los experimentos en animales *in vivo* han demostrado que es capaz de la inhibición *in vitro* de la proliferación y migración de células endoteliales inducidas por VEGF, y que puede inhibir el crecimiento de tumores en el cuerpo del animal. Se puede usar para tratar tumores.

La presente invención proporciona además la aplicación de dicho anticuerpo monoclonal en la preparación de fármacos para tratar tumores. Dicho anticuerpo diana se puede usar en estudios asociados al VEGF, tales como estudios en una variedad de campos, incluyendo biología del desarrollo, citobiología, metabolismo, biología estructural y genómica funcional, o estudios médicos y farmacéuticos aplicables sobre tumores, AMD, enfermedades neurodegenerativas, obesidad y diabetes, etc.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende una

cantidad eficaz del anticuerpo monoclonal anterior y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona además un reactivo, kit o chip que comprende el anticuerpo monoclonal anterior.

También se describe un método para usar el anticuerpo diana en la inhibición de la actividad de VEGF y usar el anticuerpo diana en el tratamiento de enfermedades asociadas al VEGF o usar un kit que contiene dicho anticuerpo en la realización de un diagnóstico y un análisis asociados al VEGF.

Cuando se prepara la molécula de anticuerpo de acuerdo con la presente invención, se puede purificar con cualquier método conocido en la técnica para purificar moléculas de inmunoglobulina, por ejemplo, cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, en particular la cromatografía de afinidad para antígenos específicos por medio de la proteína A y otra cromatografía en columna), centrifugación, diferencia de solubilidad o cualquier otra técnica estándar para purificar proteínas. En muchas realizaciones, el anticuerpo se segrega desde las células al medio de cultivo, y el anticuerpo se obtiene por recogida del medio de cultivo y purificación

El anticuerpo se puede modificar por una variedad de modos, puede producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que retienen la especificidad del anticuerpo original utilizando la tecnología de DNA recombinante. Esta tecnología puede introducir DNA que codifica dominios variables de inmunoglobulina o las CDR del anticuerpo en dominios constantes o dominios constantes más regiones de entramado de diferentes inmunoglobulinas. Véanse los documentos EP. A-184187, GB 2188638A o EP. A-239400. La mutación génica u otros cambios también se pueden realizar en hibridomas u otras células que producen anticuerpos, que pueden cambiar o no cambiar la especificidad de unión de los anticuerpos producidos.

El anticuerpo monoclonal usado en la presente invención también se puede preparar con el método del hibridoma. Puesto que la secuencia de DNA que codifica el anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención se puede obtener por un medio convencional conocido por los expertos en la técnica, tal como la síntesis artificial de secuencias de aminoácidos publicada en la presente invención o la amplificación por PCR, por tanto, dicha secuencia también se puede unir a un vehículo de expresión apropiado con el método de DNA recombinante y con una variedad de métodos conocidos en la técnica. Finalmente, bajo condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo de acuerdo con la presente invención, se cultiva y transforma la célula hospedante obtenida, y luego los expertos en la técnica emplean un medio de separación y purificación convencional bien conocido para purificar el anticuerpo monoclonal de acuerdo con la presente invención.

Como se ha descrito antes, la presente invención proporciona además reactivos, kits o chips para llevar el anticuerpo de acuerdo con la presente invención. Los reactivos, kits o chips comprenden al menos uno o más de los siguientes: el anticuerpo preparado de acuerdo con el método anterior, el ribonucleótido que codifica dicho anticuerpo, o células eucariotas, células procariotas y virus que contienen dicho anticuerpo. El anticuerpo puede estar humanizado.

Otros componentes opcionales de los reactivos, kits o chips comprenden: endonucleasa de restricción, cebador y plásmido, solución tampón, etc. para realizar experimentos de análisis de la actividad del anticuerpo. Los ácidos nucleicos de dichos reactivos, kits o chips pueden comprender además sitios de endonucleasa de restricción, sitios de clones múltiple, sitios de cebadores, etc. para su conexión con los ácidos nucleicos de anticuerpos que no son de conejo. Todos los componentes de dichos agentes, kits o chips se pueden conservar individualmente en recipientes separados, o algunos componentes compatibles se pueden pre-ensamblar en un solo recipiente, según sea necesario.

Cuando se prepara el anticuerpo diana se pueden añadir vehículos farmacéuticamente aceptables. El término “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a uno o más ingredientes orgánicos o inorgánicos, que pueden ser naturales o sintéticos y pueden promover la aplicación del anticuerpo después de combinarse con el anticuerpo. Los vehículos farmacéuticamente aceptables comprenden solución salina estéril u otras soluciones iso-osmóticas acuosas o no acuosas y suspensiones estériles que estén farmacéuticamente disponibles y sean conocidas en la técnica. La “dosificación eficaz” se refiere a la dosificación que puede mejorar o posponer el progreso de situaciones patológicas, degenerativas o perjudiciales.

La definición de la dosificación eficaz se basa individualmente, se considera específicamente el tratamiento de los síntomas y se buscan resultados basados en los individuos. La dosificación eficaz se determina mediante un procedimiento común en la técnica, y estos factores para aplicarla no excederán los experimentos convencionales.

Descripción del depósito del material biológico

La línea celular con el número de registro CGMCC Nº 3233 fue depositada el 20 de agosto de 2009 en CGMCC en la dirección Datun Road, Chaoyang District, Beijing, y su nombre de clasificación es célula de ovario de hámster chino.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra la inhibición competitiva de la unión de VEGF y KDR al anticuerpo recombinante expresado por los clones HZD-V1, HZD-V2, HZD-V5 y HZD-V6;

La Fig. 2 muestra la pureza del anticuerpo EPI0030 expresado por el clon HZD-V6 por SDS-PAGE;

La pista 1 es por electroforesis reductora;

La pista 2 muestra patrones de peso molecular - secuencialmente de arriba a abajo, 170 kD, 130 kD, 100 kD, 70 kD, 55 kD, 40 kD, 35 kD, 25 kD, 15 kD y 10 kD;

La pista 3 es por electroforesis no reductora;

La Fig. 3 muestra el gráfico del análisis por SEC-HPLC de la pureza del anticuerpo EPI0030 expresado por el clon HZD-V6;

La Fig. 4 muestra la actividad de unión del anticuerpo al VEGF humano determinada usando el método de unión directa a VEGF;

La Fig. 5 muestra el análisis de la CI_{50} de inhibición de la unión de VEGF y KDR a EPI0030 y AVASTIN;

CI_{50} de EPI0030 = 166,3 ng/mL, CI_{50} de AVASTIN = 253,7 ng/mL.

La Fig. 6 muestra el impacto de 5 mg/kg de EPI0030 y AVASTIN sobre el crecimiento del tumor HCT-116;

La Fig. 7 muestra el impacto de 5 mg/kg de EPI0030 y AVASTIN sobre el crecimiento del tumor NCI-H460;

La Fig. 8 muestra el impacto de 1,5 mg/kg de EPI0030 sobre el crecimiento del tumor NCI-H460.

Descripción de las realizaciones específicas

Ejemplo 1: Preparación de una célula tumoral híbrida que expresa el anticuerpo monoclonal de conejo VEGF165 humano y su clon génico

El anticuerpo monoclonal de clon de conejo se preparó con la técnica del hibridoma. Véase la Patente de EE.UU.: 7.429.487, en particular los Ejemplos 1 - 4, para planes experimentales relevantes.

En primer lugar, se preparó la proteína de fusión IgG Fc-hVEGF-A (VEGF 165 humano) por tecnología recombinante, en la que la secuencia Fc de IgG es la fuente de conejo. Se clonó la secuencia de DNA de IgG Fc-hVEGF-A en el plásmido pTT5, se transfectó transitoriamente dicho plásmido en la línea celular HEK 293-6E, se cultivaron células en medio sin suero, se recogió el líquido sobrenadante y se purificó la proteína de fusión IgG Fc-hVEGF-A expresada transitoriamente que se purificó con una columna de Proteína A.

Se usó la IgG Fc-hVEGF-A purificada (como componente antigénico) para mezclar con el adyuvante de Freund completo en inyección hipodérmica multipuntos para la primera inmunización en conejos de Nueva Zelanda, y luego se mezcló la proteína purificada con el adyuvante de Freund incompleto en inyección hipodérmica para una mejor inmunización de los conejos una vez cada tres semanas, y se usó el antígeno plus PBS en inyección intravenosa en los conejos para la inmunización final 4 días antes de la extracción del bazo.

De acuerdo con el método descrito por la patente de EE.UU. 7.429.487, se fusionaron la célula de bazo de conejo con el linfocito HRGTP-B inmortal, célula 240E-W2, que es homóloga a la célula de bazo inmunizada, en una relación de 2:1, se cultivaron en el medio HAT en una placa de 96 pocillos, luego se cribaron las células hibridomas, y los clones de células obtenidos se unen con una nueva IgG Fc-hVEGF-A para cribado.

El proceso de identificación y cribado comprende 2 etapas de cribado de clones positivos: (1) inmovilizar el antígeno IgG Fc-hVEGF-A en una placa ELISA de 96 pocillos, añadir el líquido sobrenadante de clonación y expresión e incubar durante 1 hora, lavar 3 veces con PBS, usar el anticuerpo marcado con la enzima para identificar el líquido sobrenadante del clon celular que tiene actividad de unión a IgG Fc-hVEGF-A, y de ese modo obtener clones positivos capaces de unirse directamente a IgG Fc-hVEGF-A. (2) Posteriormente, transferir los clones positivos de la etapa (1) a una placa de 24 pocillos para su cultivo para obtener más productos de expresión. Se inmovilizó la región extracelular de IgG Fc-VEGFR2 (KDR/Flk-1) en una placa ELISA de 96 pocillos, se añadió IgG Fc-hVEGF-A y el producto de clonación y expresión para que se incubaran juntos durante 1 hora, se lavó 3 veces con PBS, se usó el anticuerpo marcado con la enzima para determinar el contenido de IgG Fc-hVEGF-A de modo que se identificara la inhibición de los clones por la actividad de unión a VEGF-VEGFR2, y de ese modo identificar los clones positivos capaces de bloquear la unión a VEGF-VEGFR2.

Las células hibridomas de los clones positivos cribados se sometieron a lisis, se extrajo el mRNA y se obtuvo cDNA por transcripción inversa. Con dicho cDNA como molde, se usó el método de PCR para amplificar las secuencias de nucleótidos de los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada del anticuerpo IgG de conejo,

respectivamente, se analizaron el dominio variable de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera, comprendiendo el dominio variable de la cadena pesada codificada la secuencia precursora de SEQ ID NO. 1 (Ser Asn Asn Asp Val Met Cys Trp), la secuencia precursora de SEQ ID NO. 2 (Gly Cys Ile Met Thr Thr Asp Val Val Thr Glu Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Ser), y la secuencia precursora de SEQ ID NO. 3 (Arg Asp Ser Val Gly Ser Pro Leu Met Ser Phe Asp Leu Trp), y comprendiendo el dominio variable de la cadena ligera la secuencia precursora de SEQ ID NO. 4 (Gln Ala Ser Gln Ser Val Tyr Gly Asn Asn Glu Leu Ser), la secuencia precursora de SEQ ID NO. 5 (Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser) y la secuencia precursora de SEQ ID NO. 6 (Gly Gly Tyr Lys Ser Tyr Ser Asn Asp Gly Asn Gly). Las secuencias de nucleótidos de la cadena ligera se clonaron en el plásmido pTT5. Las secuencias de nucleótidos del dominio variable de la cadena pesada se clonaron en el plásmido pTT5 que tiene un dominio constante de la cadena pesada. Se co-transfectaron los plásmidos ligeros de la cadena pesada a la línea celular HEK 293-6E, se cultivó durante 5 días, se purificó el líquido sobrenadante con proteína A y finalmente se obtuvo el anticuerpo monoclonal anti-VEGF 165 humano recombinante de conejo. El método de cribado de clones positivo anterior se usó para confirmar la afinidad del anticuerpo recombinante expresado.

Ejemplo 2: Preparación del anticuerpo monoclonal anti-VEGF165 de conejo humanizado de acuerdo con la presente invención

Véase la Patente de EE.UU. 7.462.697, en particular su “Detailed description of preferred embodiments”, para la técnica de humanización.

De acuerdo con la técnica descrita por la Patente de EE.UU. 7.462.697, se usaron las secuencias humanas VKI-2-1-(U)-A20_JK4 y VH3-1-3-3-21_JH4 como secuencias de referencia. Se obtuvieron 4 versiones de VK y VH para cada secuencia de anticuerpo monoclonal anti-VEGF de conejo expresado después de que se hubieran humanizado. El dominio variable de la cadena ligera comprendía VK-HZD1 (por ejemplo, SEQ ID NO. 12), VK-HZD2 (por ejemplo, SEQ ID NO. 14), VK-HZD5 (por ejemplo, SEQ ID NO. 16) y VK-HZD6 (por ejemplo, SEQ ID NO. 8); el dominio variable de la cadena pesada comprendía VH-HZD1 (por ejemplo, SEQ ID NO. 11), VH-HZD2 (por ejemplo, SEQ ID NO. 13), VH-HZD5 (por ejemplo, SEQ ID NO. 15) y VH-HZD6 (por ejemplo, SEQ ID NO 7). En comparación con VK-HZD1, VK-HZD2 tiene 2 residuos diferentes en la CDR1. VK-HZD1 y VK-HZD2 se conviertieron en VK-HZD5 y VK-HZD6, respectivamente, añadiendo dos residuos de aminoácidos más a su extremo N. VH-HZD1 y VH-HZD2 tenían diferentes residuos en la posición 71, la posición 71 de VH-HZD1 es K, mientras que la posición 71 de VH-HZD2 es R. Las secuencias VK(H)-HZD1 y VK(H)-HZD2 comprendían péptidos de señal de conejo, mientras que las secuencias VK(H)-HZD5 y VK(H)-HZD6 comprendían péptidos de señal humanos.

Después de la síntesis artificial, se clonaron las secuencias de DNA de las 4 versiones de VK y VH en plásmidos pTT5 que tenían secuencias de CK humanas y secuencias de CH humanas, respectivamente, para expresar el anticuerpo por medio de péptidos de señal humanos. Se co-transfectaron los dos plásmidos anteriores a la célula HEK 293-6E, y se expresó transitoriamente el anticuerpo anti-VEGF humanizado. De acuerdo con el método de cribado del Ejemplo 1, los clones HZD-V6 seleccionados tenían una afinidad apropiada como los clones que se deben usar en el extremo, y el anticuerpo anti-VEGF humanizado expresado de ese modo se denominó EPI0030, y sus secuencias de aminoácidos eran la cadena pesada mostrada por SEQ ID NO. 9 y la cadena ligera mostrada por SEQ ID NO. 10.

Para aumentar el rendimiento y obtener la línea celular para producción industrial, se co-transfectaron los plásmidos de expresión que tenían secuencias de aminoácidos de la cadena pesada mostrada por SEQ ID NO. 9 y la cadena ligera mostrada por SEQ ID NO. 10 en la línea celular de ovario de hámster chino (CHO), que se depositó el 20 de agosto de 2009 en CGMCC en la dirección Datun Road, Chaoyang District, Beijing con el número de registro CGMCC No. 3233.

Ejemplo 3: Inspección de la unión del anticuerpo monoclonal EPI0030 de acuerdo con la presente invención a VEGF

El anticuerpo anti-VEGF se une a VEGF para bloquear su unión con el receptor KDR e inhibir el canal de señal de VEGF. Después de la dilución 1:3 en serie de diferentes anticuerpos recombinantes (HZD-V1, HZD-V2, HZD-V5, HZD-V6) y AVASTIN (90 µg/mL - 45 ng/mL), se mezcló con IgG Fc-hVEGF (1 µg/mL), se añadió el complejo mixto anticuerpo-VEGF a los pocillos de una placa revestidos con IgG Fc-VEGFR2 y después de añadir el anticuerpo anti-VEGF humano de ratón, se detectó por medio del desarrollo del color con anticuerpo IgG anti-ratón de cabra-AP. Los resultados mostraron que los anticuerpos recombinantes expresados tenían una actividad similar a AVASTIN en la inhibición competitiva de la unión de VEGF a KDR. Los resultados de la medición muestran que todos los anticuerpos expresados por los clones HZD-V1, HZD-V2, HZD-V5 y HZD-V6 podían bloquear la unión de VEGF a KDR (véase la Fig. 1).

Con referencia al procedimiento experimental anterior, se determinaron los valores de CI_{50}, es decir, las concentraciones inhibidoras medianas, de EPI0030 y AVASTIN. Los resultados se muestran en la Fig. 5, que muestra que EPI0030 y AVASTIN tienen una actividad de inhibición competitiva similar.

Se usó BIAcore-3000 para determinar la K_d de EPI0030 con VEGF. Se inmovilizó VEGF humano en el chip CM5, se inyectaron EPI0030 y AVASTIN después de dilución 2 veces en serie en la solución tampón HBS-EP con el caudal

de 30 µL/min. La K_d es constante de velocidad de disociación/constante de velocidad de asociación (k_{off}/k_{on}). Las constantes de disociación de EPI0030 y AVASTIN con VEGF humano se muestran en la Tabla 1, la constante de disociación de EPI0030 con VEGF es 0,485 nM, que es 1/100 la de AVASTIN, lo que indica que la capacidad de unión de EPI0030 a VEGF es más fuerte que la de AVASTIN.

Tabla 1. Constantes de disociación de EPI0030 y AVASTIN con VEGF humano

	K_d (nM)			
	Experimento 1	Experimento 2	Valor medio	STD
EPI0030	0,331	0,638	0,485	0,217
AVASTIN	61,9	33,8	47,9	19,9

Ejemplo 4: Caracterización del anticuerpo monoclonal EPI0030 de acuerdo con la presente invención y determinación de su actividad *in vitro*

Después de purificar el anticuerpo EPI0030 expresado transitoriamente por el clon HZD-V6 de la célula HEK 293-6E, se realizó un análisis de calidad asociado con los elementos de análisis específicos como sigue:

A: pureza

Se usó SDS-PAGE (reductora y no reductora) y SEC-HPLC para analizar la pureza con los resultados mostrados en la Fig. 2 y la Fig. 3, lo que indica que la pureza del anticuerpo EPI0030 es mayor del 98%, el contenido de polímero es menor del 5%, el área del pico principal (tiempo de retención 10,572 minutos) es mayor que el 95% del área total (incluidos los picos 1, 2 y 3 de izquierda a derecha) y los picos 1 y 2 son polímeros.

B: actividad de unión *in vitro*

Se usó IgG Fc-hVEGF para revestir la placa, se usó BSA al 1% para sellar, se diluyó el anticuerpo EPI0030 y AVASTIN con una dilución 1:3 en serie a 8 grados (1 µg/mL – 0,46 ng/mL), se añadió a los pocillos revestidos con IgG Fc-hVEGF, y se añadió anticuerpo IgG anti-humano de burro para la detección de AP. Los resultados mostraron que el anticuerpo EPI0030 y AVASTIN tenían una actividad de unión similar.

Se usó el método ELISA, que incluye el método de unión directa a IgG Fc-hVEGF (véase el Ejemplo 1) y el método de unión competitiva a KDR (Ejemplo 3). Los resultados mostraron que la unión del anticuerpo EPI0030 a VEGF estaba correlacionada con la inhibición de la unión de VEGF a KDR en términos de dosificación, que se muestran en la Fig. 4 y la Fig. 5

Ejemplo 5: Detección de la actividad *in vivo* del anticuerpo monoclonal EPI0030 de acuerdo con la presente invención

Dos semanas antes del experimento, se tomó una línea de células de cáncer de colon humano HCT-116 congelada y células de cáncer de pulmón no microcítico humano NCI-H460 (aproximadamente $1x10^7$ células) del depósito de nitrógeno líquido, y se colocaron rápidamente en un baño de agua a 37ºC para que se fundieran. A continuación, se inocularon las células en matraces de cultivo celular de 75 cm^2 con medio de McCoy 5A y medio DMEM que habian sido precalentados hasta 37ºC y se añadió suero de ternera fetal al 10% (adquirido a GIBCO), respectivamente, se subcultivó a 1:5 cuando las células crecieron hasta una tasa de fusión del 80% y se subcultivaron *in vitro* tres veces consecutivas. Cuando la cantidad total de células alcanzó el número requerido por la inoculación, se sometieron las células a digestión con enzima pancreática y se centrifugaron, se usó PBS para lavar las células para eliminar el suero y, por último, se usó medio de McCoy 5A exento de antibióticos y exento de suero y medio DMEM para ajustar las densidades de las células HCT-116 de cáncer de colon humano procesado y las células NCI-H460 de cáncer de pulmón no microcítico humano hasta $5x10^7$/mL, respectivamente, se colocó la suspensión celular en hielo, se inoculó a la parte ventral de ratones atímicos de 6 - 8 semanas, se inoculó 0,1 mL a cada ratón, es decir, $5x10^6$ células/ratón. Se usó un calibrador para medir el diámetro del tumor de los ratones atímicos cada 2 días, cuando los tumores de todos los ratones crecieron hasta 100 mm^3 - 300 mm^3, se seleccionaron los que tenían un volumen de tumor SD < 1/3, se separaron aleatoriamente en 5 grupos con 6 por grupo. Los grupos modelo de cáncer de colon humano HCT-116 eran el grupo de control modelo (1 grupo), 5 mg/kg de AVASTIN (1 grupo) y 5 mg/kg de EPI0030 (1 grupo) y se usó una solución salina fisiológica para diluir AVASTIN y EPI0030 hasta 0,5 mg/mL. Los grupos modelo de cáncer de pulmón no microcítico humano NCI-H460 eran el grupo de control modelo (1 grupo), 5 mg/kg de AVASTIN (1 grupo) y 1,5 mg/kg, 5 mg/kg de EPI0030 (2 grupos), y se usó solución salina fisiológica para diluir AVASTIN y EPI0030 hasta 0,5 mg/mL y 0,15 mg/mL. Para los grupos de administración de fármacos, se administraron 0,2 mL de AVASTIN y EPI0030 por inyección intraperitoneal, respectivamente, una vez 1, 3 y 5 días

de cada semana, y se administraron 0,2 mL de solución salina fisiológica a los grupos de control modelo al mismo tiempo y de la misma manera, y la administración se continuó durante 3 semanas (21 días, un total de 9 veces).

Se midió el diámetro máximo a y el diámetro mínimo b de los nódulos tumorales de los ratones atímicos, se calculó el volumen del tumor de acuerdo con la ecuación, $V = 0,5 \times a \times b^2$, y se usó la tasa relativa de crecimiento del tumor, T/C%, como índice para evaluar la eficacia de curación.

Los resultados mostraron que en el modelo de cáncer de colon humano HCT-116, las tasas de inhibición tumoral de EPI0030 y AVASTIN en el grupo de 5 mg/kg eran 65,7% y 15,7%, respectivamente (véase la Fig. 6). En el modelo de cáncer de pulmón no microcítico humano NCI-H460, las tasas de inhibición tumoral de EPI0030 y AVASTIN eran del 95,5% y 66,7%, respectivamente (véase la Fig. 7); y en el grupo de 1,5 mg/kg, la tasa de inhibición tumoral de EPI0030 era 57,6% (véase la Fig. 8). Los resultados mostraron que EPI0030 tenía una capacidad notable para inhibir el crecimiento tumoral.

Con referencia a las indicaciones clínicas de AVASTIN, se eligieron modelos tumorales de xenoinjerto de cáncer de colon humano HCT-116 y cáncer de pulmón no microcítico humano NCI-H460 en ratones atímicos para verificar la inhibición del cáncer de colon humano y del cáncer de pulmón no microcítico humano por EPI0030, demostrando que EPI0030 tenía una notable inhibición de los tumores de xenoinjerto de cáncer de colon humano y de cáncer de pulmón no microcítico humano. En los modelos, EPI0030 tenía una actividad de inhibición tumoral más fuerte que AVASTIN.

Listado de secuencias

<110> Jiangsu Simcere Pharmaceutical R & D CO., LTD.
Epitomics, Inc

<120> Anticuerpo monoclonal anti-VEGF y composición farmacéutica que comprende dicho anticuerpo

<130> OP100444

<160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> CDR1 de región variable de cadena pesada

<400> 1
Ser Asn Asn Asp Val Met Cys Trp
1 5

<210> 2
<211> 18
<212> PRT
<213> CDR2 de región variable de cadena pesada

<400> 2
Gly Cys Ile Met Thr Thr Asp Val Val Thr Glu Tyr Ala Asn Trp Ala
1 5 10 15

Lys Ser

<210> 3
<211> 14
<212> PRT
<213> CDR3 de región variable de cadena pesada

<400> 3
Arg Asp Ser Val Gly Ser Pro Leu Met Ser Phe Asp Leu Trp
1 5 10

<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> CDR1 de región variable de cadena ligera

<400> 4
Gln Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Asn Asn Asn Glu Leu Ser
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> CDR2 de región variable de cadena ligera

<400> 5
Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
1 5

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> CDR3 de región variable de cadena ligera

<400> 6
Gly Gly Tyr Lys Ser Tyr Ser Asn Asp Gly Asn Gly
1 5 10

<210> 7
<211> 141
<212> PRT
<213> Región variable de cadena pesada

<400> 7
Met Glu Leu Gly Leu Arg Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe
35 40 45

Ser Asn Asn Asp Val Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly Cys Ile Met Thr Thr Asp Val Val Thr Glu Tyr
65 70 75 80

Ala Asn Trp Ala Lys Ser Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Ser Ala Lys
85 90 95

Asn Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
100 105 110

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Val Gly Ser Pro Leu Met Ser Phe
115 120 125

Asp Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 8
<211> 134
<212> PRT
<213> Región variable de cadena ligera

<400> 8

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Asp Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser
35 40 45

Gln Ser Ile Tyr Asn Asn Asn Glu Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gly Gly Tyr Lys Ser Tyr Ser Asn Asp Gly Asn Gly Phe Gly Gly Gly
115 120 125

Thr Lys Val Glu Ile Lys

130

<210> 9
<211> 471
<212> PRT
<213> Cadena pesada

<400> 9

Leu Glu Trp Ile Gly Cys Ile Met Thr Thr Asp Val Val Thr Glu Tyr
65 70 75 80

Ala Asn Trp Ala Lys Ser Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Ser Ala Lys
85 90 95

Asn Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
100 105 110

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Val Gly Ser Pro Leu Met Ser Phe
115 120 125

Asp Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
210 215 220

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
225 230 235 240

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
245 250 255

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
260 265 270

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
275 280 285

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
290 295 300

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
305 310 315 320

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

325 330 335

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
340 345 350

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
355 360 365

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
370 375 380

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
385 390 395 400

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
405 410 415

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
420 425 430

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
435 440 445

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
450 455 460

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470

<210> 10
<211> 241
<212> PRT
<213> Cadena ligera

<400> 10
Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Asp Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser
35 40 45

Gln Ser Ile Tyr Asn Asn Asn Glu Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gly Gly Tyr Lys Ser Tyr Ser Asn Asp Gly Asn Gly Phe Gly Gly Gly
115 120 125

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
130 135 140

Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val
145 150 155 160

Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
165 170 175

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
180 185 190

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu
195 200 205

Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr
210 215 220

His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
225 230 235 240

Cys

<210> 11
<211> 140
<212> PRT
<213> HZD1 Región variable de cadena pesada

<400> 11
Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Ser
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro
20 25 30

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser
35 40 45

Asn Asn Asp Val Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Cys Ile Met Thr Thr Asp Val Val Thr Glu Tyr Ala
65 70 75 80

Asn Trp Ala Lys Ser Arg Phe Thr Val Ser Lys Asp Ser Ala Lys Asn
85 90 95

Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Val Gly Ser Pro Leu Met Ser Phe Asp
115 120 125

Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 12
<211> 134
<212> PRT
<213> HZD1 Región variable de cadena ligera

<400> 12
Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Leu Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser
35 40 45

Gln Ser Val Tyr Gly Asn Asn Glu Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gly Gly Tyr Lys Ser Tyr Ser Asn Asp Gly Asn Gly Phe Gly Gly Gly
115 120 125

Thr Lys Val Glu Ile Lys
130

<210> 13
<211> 140
<212> PRT
<213> HZD2 Región variable de cadena pesada

<400> 13

Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Ser
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro
20 25 30

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser
35 40 45

Asn Asn Asp Val Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Cys Ile Met Thr Thr Asp Val Val Thr Glu Tyr Ala
65 70 75 80

Asn Trp Ala Lys Ser Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn
85 90 95

Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Val Gly Ser Pro Leu Met Ser Phe Asp
115 120 125

Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 14
<211> 134
<212> PRT
<213> HZD2 Región variable de cadena ligera

<400> 14
Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Leu Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser
35 40 45

Gln Ser Ile Tyr Asn Asn Asn Glu Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gly Gly Tyr Lys Ser Tyr Ser Asn Asp Gly Asn Gly Phe Gly Gly Gly
115 120 125

Thr Lys Val Glu Ile Lys
130

<210> 15
<211> 141
<212> PRT
<213> HZD5 Región variable de cadena pesada

<400> 15
Met Glu Leu Gly Leu Arg Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe
35 40 45

Ser Asn Asn Asp Val Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly Cys Ile Met Thr Thr Asp Val Val Thr Glu Tyr
65 70 75 80

Ala Asn Trp Ala Lys Ser Arg Phe Thr Val Ser Lys Asp Ser Ala Lys
85 90 95

Asn Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
100 105 110

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Ser Val Gly Ser Pro Leu Met Ser Phe
115 120 125

Asp Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 16
<211> 134
<212> PRT
<213> HZD5 Región variable de cadena ligera

<400> 16

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Pro Asp Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser
35 40 45

Gln Ser Val Tyr Gly Asn Asn Glu Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gly Gly Tyr Lys Ser Tyr Ser Asn Asp Gly Asn Gly Phe Gly Gly Gly
115 120 125

Thr Lys Val Glu Ile Lys
130

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a VEGF, caracterizado porque el dominio variable de su cadena pesada comprende secuencias de aminoácidos de CDR 1-3 que consisten respectivamente en la SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2 y SEQ ID NO. 3, y el dominio variable de su cadena ligera comprende secuencias de aminoácidos de CDR 1-3 que consisten respectivamente en SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5 y SEQ ID NO. 6.

2. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho anticuerpo monoclonal se selecciona de un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado.

3. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la secuencia de aminoácidos del dominio variable de su cadena pesada está representado por SEQ ID NO. 7; o el dominio variable de su cadena pesada tiene una identidad de al menos 95% con la SEQ ID NO. 7 y dicho anticuerpo monoclonal tiene la actividad de unirse específicamente al VEGF.

4. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la secuencia de aminoácidos del dominio variable de su cadena ligera está representado por SEQ ID NO. 8; o el dominio variable de su cadena ligera tiene una identidad de al menos 95% con la SEQ ID NO. 8 y dicho anticuerpo monoclonal tiene la actividad de unirse específicamente al VEGF.

5. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la secuencia de aminoácidos de su cadena pesada está representada por SEQ ID NO. 9; o su cadena pesada tiene una identidad de al menos 95% con la SEQ ID NO. 9 y dicho anticuerpo monoclonal tiene la actividad de unirse específicamente al VEGF.

6. El anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la secuencia de aminoácidos de su cadena ligera está representada por SEQ ID NO. 10; o su cadena ligera tiene una identidad de al menos 95% con la SEQ ID NO. 10 y dicho anticuerpo monoclonal tiene la actividad de unirse específicamente al VEGF.

7. Un anticuerpo monoclonal producido por la línea celular depositada con el número de registro CGMCC Nº 3233.

8. Una línea celular, caracterizada porque está depositada en CGMCC con el número de registro CGMCC Nº 3233.

9. Anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 – 7, para uso en el tratamiento de tumores.

10. Una composición farmacéutica, caracterizada porque comprende una cantidad eficaz del anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 – 7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

11. Un reactivo, kit o chip, que comprende el anticuerpo monoclonal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 – 7.

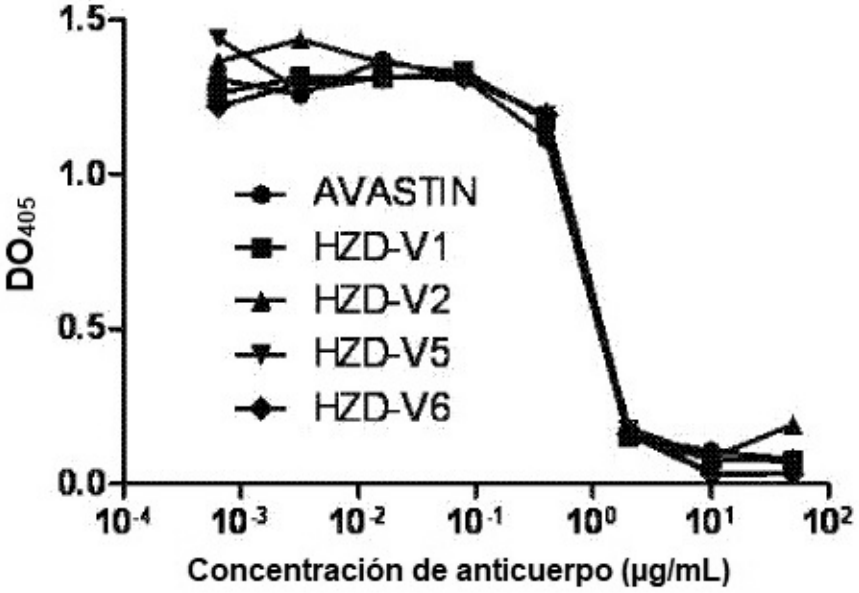
1.5
1.0
0.5
0.0
DO405
AVASTIN
HZD-V1
HZD-V2
HZD-V5
HZD-V6
10-4
10-3
10-2
10-1
100
101
102
Concentración de anticuerpo (µg/mL)

FIG. 1

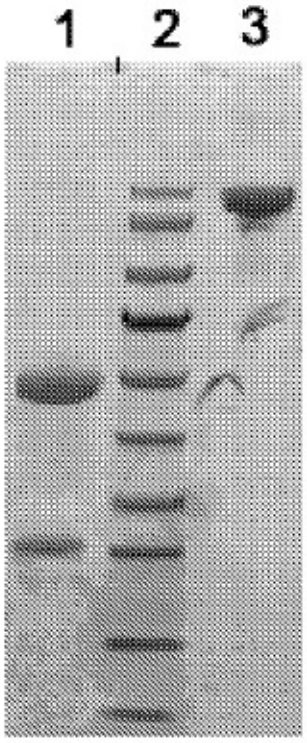
1
2
3

FIG. 2

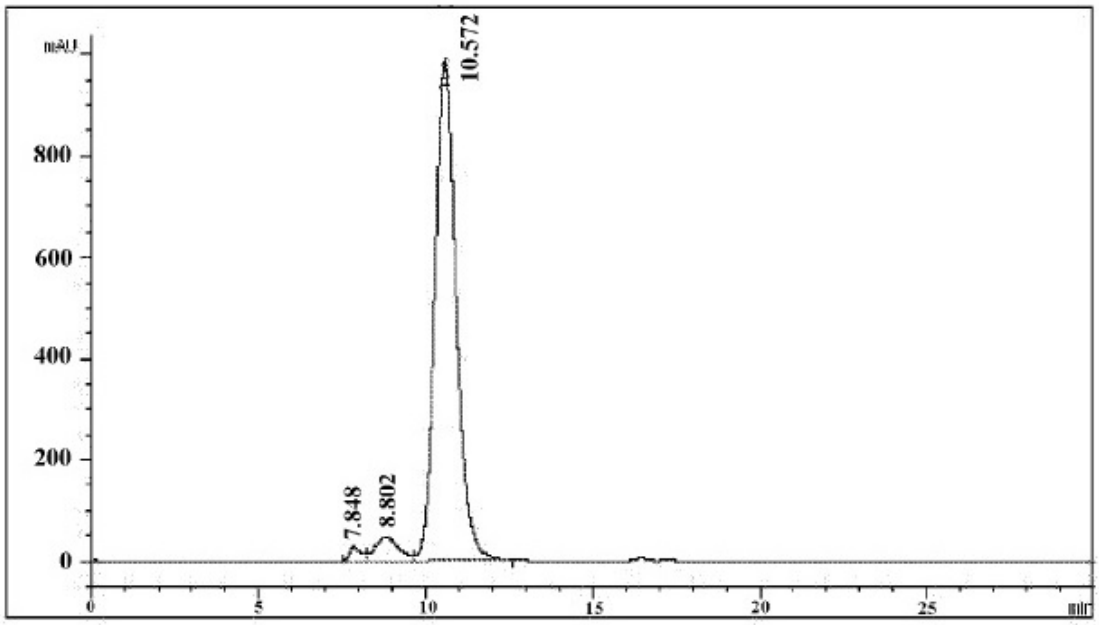
mAU
800
600
400
200
0
10.572
7.848
8.802
0
5
10
15
20
25
min

FIG. 3

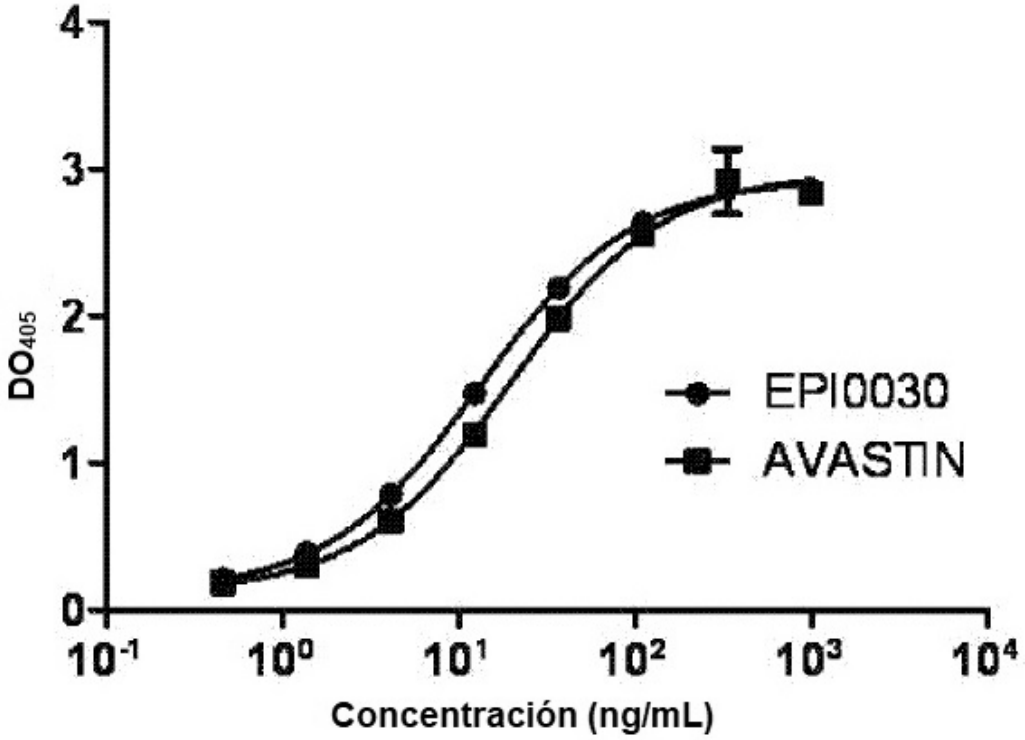
4
3
2
1
0
DO405
EPI0030
AVASTIN
10-1
100
101
102
103
104
Concentración (ng/mL)

FIG. 4

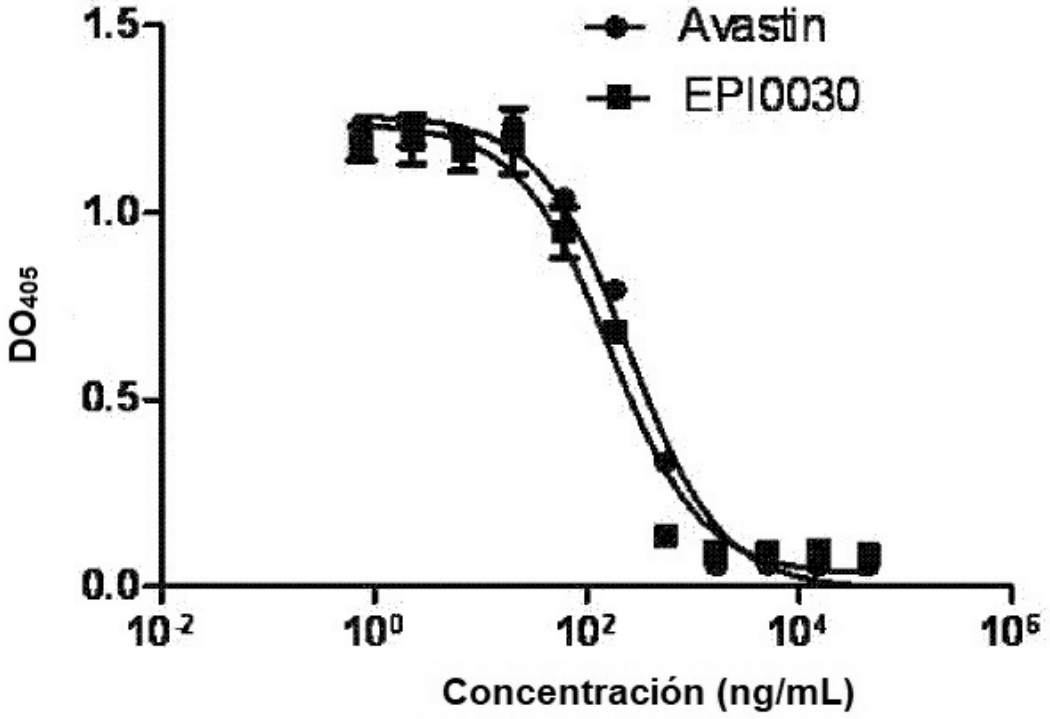
Avastin
EPI0030
1.5
1.0
0.5
0.0
DO405
10-2
100
102
104
106
Concentración (ng/mL)

FIG. 5

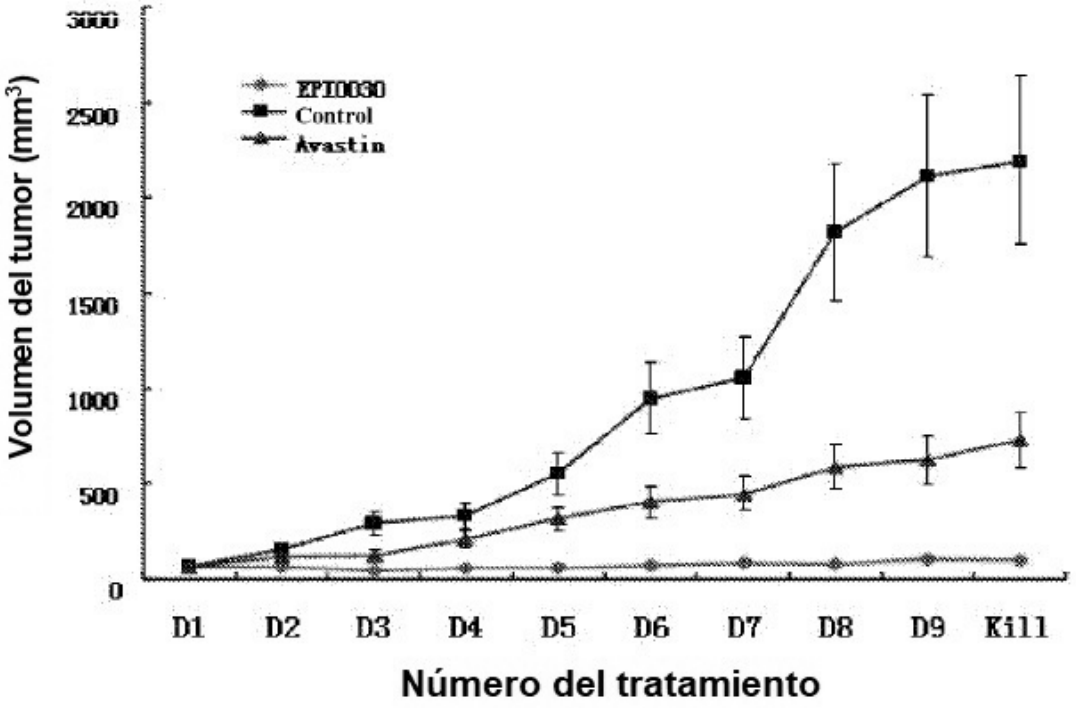
EPI0030
Control
Avastin
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Volumen del tumor (mm3)
D1
D2
D3
D4
D5
D6
D7
D8
D9
Kill
Número del tratamiento

FIG. 6

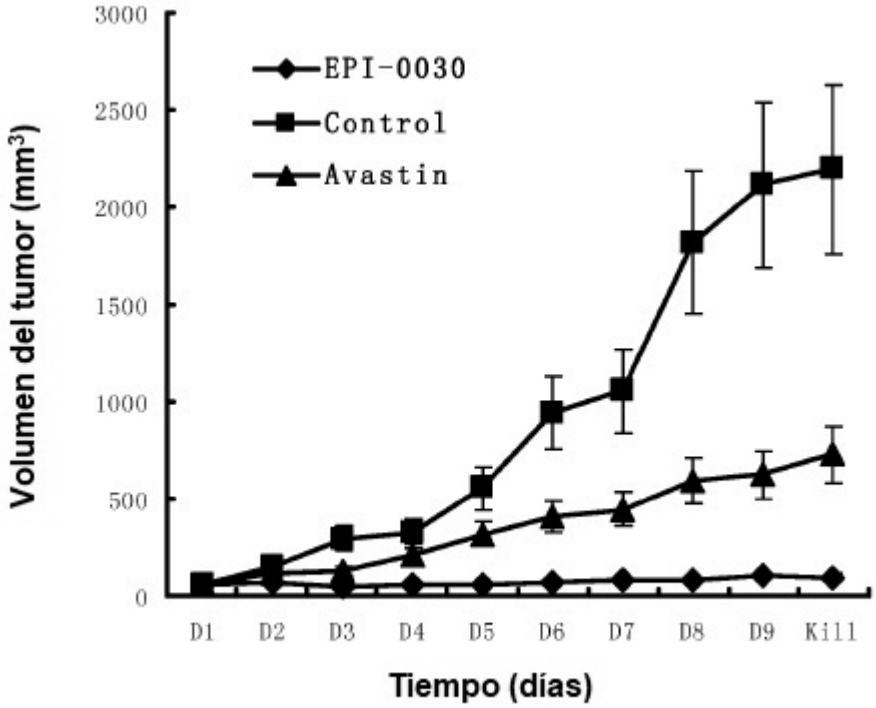
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Volumen del tumor (mm³)
EPI-0030
Control
Avastin
D1
D2
D3
D4
D5
D6
D7
D8
D9
Kill
Tiempo (días)

FIG. 7

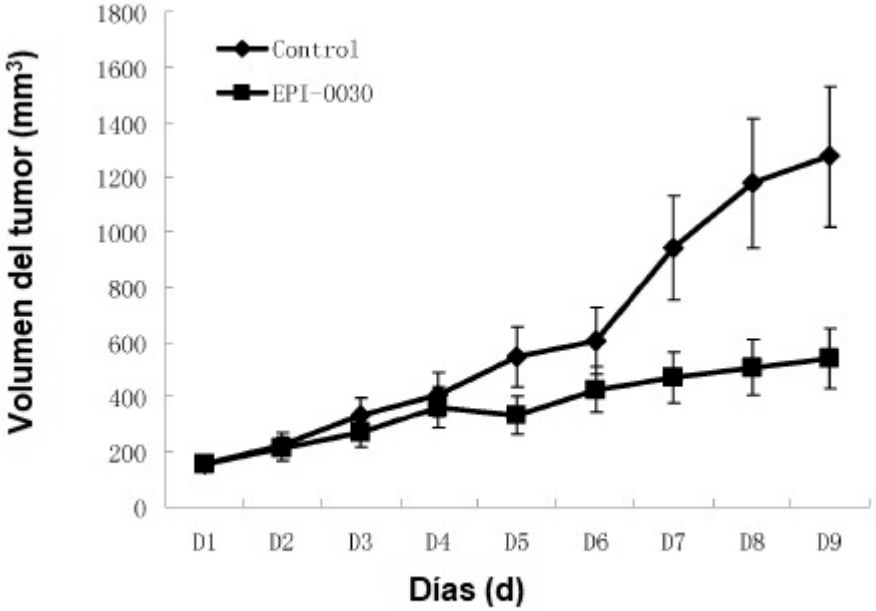
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Volumen del tumor (mm³)
Control
EPI-0030
D1
D2
D3
D4
D5
D6
D7
D8
D9
Días (d)

FIG. 8